

Mismatch repair dependent processing of O6-methylguanine adducts in *Xenopus* egg extracts

Doctoral Thesis

Author(s):

Olivera Harris, Maite

Publication date:

2013

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010000463>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH NO. 21284

**MISMATCH REPAIR DEPENDENT
PROCESSING OF O6-METHYLGUANINE
ADDUCTS IN *XENOPUS* EGG EXTRACTS**

**A dissertation submitted to
ETH ZURICH**

**for the degree of
Doctor of Sciences**

**Presented by
MAITE OLIVERA HARRIS**

Dipl. Biol. Westfälische-Wilhelms-Universität Muenster

31.01.1984

Citizen of PERU

Accepted on the recommendation of

**Prof. Josef Jiricny
Prof. Ulrike Kutay
Dr. med Vincenzo Costanzo**

2013

1 Zusammenfassung

Die Fehlpaarungsreparatur (auf englisch, mismatch repair oder MMR) einer Zelle hat die Aufgabe, Mutationen, die durch Fehlbasenpaarung in unserem Genom entstehen, zu verhindern. Demzufolge korrigiert es biosynthetische Fehler in unserer DNS (Fehlpaarung von Basen, Insertionen und Deletionen) die während der Replikation eingebaut werden können. Ihre Aufgaben umfassen nicht nur die Überprüfung der Lesefunktion der Polymerasen während der Replikation, sondern auch die meiotische und mitotische Rekombination, die Stabilität von repetitiven Trinukleotiden und die Reaktion auf DNS-Schäden.

S_N1-methylierenden Substanzen wie Temozolomid und Dacarbazin und ähnlichen nicht-klinischen Substanzen wie N-Methyl-N-nitro-Nitronitrosoguanidin (MNNG) und N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) verursachen eine Vielzahl von Addukten. Obwohl die meisten davon veränderte Stickstoffatome von Purin-basen sind, ist die Toxizität dieser Substanzen nicht darauf zurückzuführen, sondern auf O⁶-methylguanin (^meG). Dieses Addukt ist jedoch für weniger als 8% der Methylierungen in der Zelle verantwortlich und ist trotz dessen das einzige toxische Addukt.

Die Fehlpaarungsreparatur spielt eine wichtige Rolle bei den zellulären Antworten auf diese Wirkstoffe. Inwiefern die Prozessierung der ^meG-Addukte bei MMR während der Replikation für den Zelltod im zweiten Zellzyklus verantwortlich ist, bleibt jedoch eine offene Frage.

Es gibt zwei Hypothesen, die versuchen Klarheit über das Thema zu bringen. Die erste besagt, dass die repetitiven Reparatur-versuche der Fehlpaarungsreparatur den Schaden zu korrigieren, der sich aber im Eltern-doppelstrang befindet und deshalb nicht korrigierbar ist, den Zelltod bringen. Dies würde die Tatsache erklären, dass zelluläre Checkpoints erst im zweiten Zellzyklus deutlich aktiviert werden, und nicht gleich nach der Fehlpaarungs-erkennung. Das zweite Modell behauptet, MMR könne direkt mit zellulären Checkpoint-Proteinen interagieren und somit auf eine sehr direkte Weise den Checkpoint aktivieren. Dieses Modell basiert auf wissenschaftlichen Publikationen, die Interaktionen zwischen MMR Proteinen und Checkpoint-Proteinen nachgewiesen haben. Eierextrakte aus dem Frosch *Xenopus laevis* sind eine etablierte Methode, um Replikationsabhängige Signalkaskaden zu untersuchen. Sie erlauben die *in vitro*

Replizierung von spezifische DNS Vorlagen und dienen dazu, die Dynamik waehrend der Replikation unter verschiedenen Bedingungen naeher zu untersuchen. In unserem Fall war die Replikation nicht-methylierter und methylierter DNS von Interesse. In dieser Studie wurde wissenschaftlich nachgewiesen, dass MMR Proteine und Checkpoint-Proteine nicht unbedingt gleichzeitig zu ^{me}G in der DNS rekrutiert werden. Darueber hinaus wurde festgestellt, dass keine MMR-abhänginge Aktivierung eines Checkpoints sofort nach Erkennung der ^{me}G-Substrate stattfindet. Dabei zeigte sich, dass ein transienter Checkpoint nach Erkennung von MMR Substraten zwar zu sehen ist, aber dies nicht ^{me}G spezifisch ist. Hinzu kommt, dass MMR-abhängige Zwischenprodukte in der DNS nachgewiesen werden konnten. Diese entstehen durch die Reparaturversuchen des MMR Systems von ^{me}Gs in der DNS und wirken sich tatsächlich negativ auf eine weitere Replikation aus. Zum Schluss sind wir zu der Erkenntnis gekommen, dass die Erkennung von ^{me}G-Substraten bei der Fehlpaarungsreparatur nicht ausreichend ist, um das Phänomen des Zelltodes im zweiten Zyklus zu erklären.

2 Abstract

The mismatch repair system is part of the cellular machinery assigned to obfuscate mutations that might perturb canonical base pairing in the genome. As such it corrects DNA biosynthetic errors (base-base mismatches and insertion-deletion loops) that arise during replication. Its functions extend beyond proofreading errors of replicative polymerases, to meiotic and mitotic recombination, triplet repeat stability and the DNA damage response.

S_N1-type methylating agents such as temozolomide and dacarbazine and their non-clinical counterparts N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and N-methyl-N-nitrosourea (MNU) generate a variety of lesions. Of these, more than 80% are modified purine nitrogen atoms, but their toxicity appears to result from the processing of O⁶-methylguanine (^{me}G) despite the fact that this lesion only accounts for up to 8% of the generated lesions.

MMR has been found to be a major player in checkpoint and apoptotic responses attributed to this type of damage. To what extent MMR-dependent processing of the adducts during replication is the ultimate cause of cell arrest/death remains a topic of discussion. Currently, two models tackle the involvement of MMR in the processing of methylation-induced damage. The first posits that MMR activates damage signaling indirectly through its repetitive attempts at processing ^{me}G lesions in the template strand during replication. This would accommodate the fact that the MMR-dependent cell cycle arrest in G2/M is only observed in the second cycle and not immediately after ^{me}G recognition by the repair machinery. Alternatively, binding of the MMR system to the mismatch is sufficient to trigger kinase activation. This model is mainly substantiated by reported interactions between MMR and the ATR checkpoint machinery upon treatment with S_N1-type alkylators.

The *Xenopus* egg extract technique has surfaced as a unique tool for analysis of replication-dependent DNA damage signaling. This experimental system initiates replication on defined templates within a biochemical setup and is able to closely follow the dynamics of template replication. In our case, it enabled the study of MMR activity during replication of alkylation damaged and undamaged DNA templates.

Here, we show that recruitment of the ATR checkpoint machinery to sites of alkylation damage, or more specifically O6-methylguanine, is not simultaneous with that of MMR proteins. Furthermore, an accumulation of ^{me}G/T mismatches during replication, a preferred MMR substrate, is in itself not enough to trigger prolonged checkpoint activation. Finally, we show that gaps arise in DNA due to MMR-dependent ^{me}G processing behind the fork and that they largely escape checkpoint surveillance. In conclusion, these results substantiate that mere presence of either ^{me}G/C or ^{me}G/T in the DNA during a first round of replication is an unlikely cause for checkpoint activation and the G2 arrest seen during the second cell cycle, and that it is rather the presence of ^{me}G-dependent gaps which can be deleterious to further replication.